

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLÓGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV STÁRNUTÍ LISTŮ NA OBSAH ENZYMU RUBISCO

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

ZUZANA MATULKOVÁ

BRNO 2008



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

VLIV STÁRNUTÍ LISTŮ NA OBSAH ENZYMU RUBISCO

INFLUENCE OF LEAF AGE ON THE RUBISCO CONTENT

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

ZUZANA MATULKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

PhDr. MIROSLAV HRSTKA, Ph.D.

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce

FCH-BAK0190/2007

Akademický rok: **2007/2008**

Ústav

Ústav chemie potravin a biotechnologií

Student(ka)

Matulková Zuzana

Studijní program

Chemie a technologie potravin (B2901)

Studijní obor

Potravinářská chemie (2901R021)

Vedoucí bakalářské práce

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

Konzultanti bakalářské práce

Název bakalářské práce:

Vliv stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco

Zadání bakalářské práce:

1. Stručně popsat fotosyntézu, funkci a vlastnosti enzymu Rubisco a metody stanovení jeho obsahu.
2. V průběhu vegetační sezóny odebírat vzorky listů buku lesního, zpracovávat je a uchovávat předepsaným způsobem.
3. U odebraných vzorků stanovit obsah enzymu Rubisco metodou SDS-PAGE.
4. Formulovat závěry o vlivu stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco u buku lesního.

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.5.2008

Bakalářská práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Zuzana Matulková
student(ka)

PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.
Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

V bakalářské práci je popsán vliv stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco u buku lesního (*Fagus sylvatica*) rostoucího za normální a zvýšené atmosférické koncentrace oxidu uhličitého. Odběr vzorků probíhal na Experimentální ekologické stanici Ústavu systémové biologie a ekologie AV ČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech. Ke stanovení byly odebrány tři sady vzorků – první 22. 5. 2007, druhá 24. 7. 2007 a třetí pak 4. 9. 2007. Obsah enzymu Rubisco v listech byl stanoven metodou SDS-PAGE. U buků pěstovaných při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého došlo v průběhu vegetačního období k aklimační depresi obsahu enzymu Rubisco. Naopak u buků rostoucích za normální koncentrace oxidu uhličitého se obsah enzymu Rubisco v listech zvýšil.

ABSTRACT

The bachelor's thesis describes the influence of leaf senescence on the Rubisco enzyme content in beech (*Fagus sylvatica*), grown both at ambient and elevated atmospheric carbon dioxide concentration. Samples were collected at the Experimental Ecology Station, Institute of Systems Biology and Ecology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Bílý Kříž in Beskydy Mts. Three series of samples were taken in following order – the first one on 22nd May 2007, the second one on 24th July 2007, and the third one then on 4th September 2007. The Rubisco enzyme content in leafs was measured by the SDS-PAGE method. In beech trees grown in elevated carbon dioxide concentration we observed the depression of Rubisco enzyme content during the vegetation period. Contrariwise, in beeches grown in normal carbon dioxide concentration the Rubisco enzyme content increased.

KLÍČOVÁ SLOVA:

obsah Rubisco, stárnutí listů, sezónní změny, buk lesní

KEYWORDS:

Rubisco content, leaf senescence, seasonal changes, beech

MATULKOVÁ, Z. *Vliv stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 42 s. Vedoucí bakalářské práce PhDr. Miroslav Hrstka, Ph.D.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Tato práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické Vysokého učení technického v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis autora

Poděkování:

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce, panu PhDr. Miroslavu Hrstkovi Ph.D. za veškerou pomoc a podporu a za odborné vedení mé bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD.....	5
2. TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1 Fotosyntéza	6
2.1.1 Rychlost fotosyntézy	9
2.1.1.1 Vliv světla.....	9
2.1.1.2 Vliv CO_2 a jeho zvýšené koncentrace na rostliny	9
2.1.1.3 Vliv teploty, interakce teploty a zvýšené koncentrace CO_2	10
2.1.1.4 Rychlost fotorespirace	10
2.1.1.5 Vodivost průduchů	11
2.1.1.6 Rychlost dýchání	11
2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)	12
2.2.1 Struktura	12
2.2.2 Karboxylace a oxygenace	14
2.2.3 Aktivace Rubisco	17
2.2.3.1 Spontánní aktivace	17
2.2.3.2 Aktivace zprostředkovaná aktivasou	18
2.2.3.3 Vliv 2-karboxyarabinitol-1-fosfátu na aktivitu Rubisco	19
2.2.3.4 Časový průběh aktivace	20
2.2.4 Obsah Rubisco	20
2.2.4.1 Vliv dusíkaté výživy	20
2.2.4.2 Vliv ozáření	21
2.3 Metody stanovení obsahu Rubisco	21
2.3.1 ELISA	21
2.3.2 Radioimunosrážecí technika	22
2.3.3 SDS-PAGE	22
2.3.4 Kapilární elektroforéza	24
2.3.5 HPLC	25
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3.1 Odběr vzorků, materiál	26
3.2 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco	27
3.2.1 Přístroje.....	27
3.2.2 Chemikálie.....	27
3.2.3 Příprava roztoků	27
3.2.3.1 Roztoky pro přípravu gelů	27
3.2.3.2 Pomocné roztoky.....	28
3.2.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin	28
3.2.4 Příprava gelů.....	28
3.2.4.1 Separační gel	28
3.2.4.2 Zaostřovací gel	28
3.2.5 Příprava vzorků.....	29
3.2.6 Elektroforéza	29
3.2.7 Zviditelnění bílkovin	29
3.2.8 Vyhodnocení.....	30
3.2.9 Výpočet.....	30

4.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
5.	ZÁVĚR.....	34
6.	POUŽITÁ LITERATURA	35
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	38

1. ÚVOD

Enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco) je pravděpodobně nejvíce studovaný rostlinný enzym, z části proto, že se v rostlinách vyskytuje ve velkém množství (tvoří 30–50 % celkového obsahu proteinů v listech), ale hlavně proto, že je velmi důležitý v metabolismu buňky. Katalyzuje fixaci oxidu uhličitého do organické molekuly během fotosyntézy a tvoří tak jedinou vstupní bránu uhlíku do biosféry.

Rubisco katalyzuje karboxylaci i oxygenaci. Příčina této dvojí funkce Rubisco tkví ve strukturní podobnosti molekul CO_2 a O_2 , které si konkurují na aktivním místě. Efektivita, či spíše neefektivita tohoto enzymu je hlavním limitujícím faktorem rychlosti fotosyntézy. V posledních letech přibývá publikací, ve kterých je snaha genovým inženýrstvím vyrobit efektivnější Rubisco a tím radikálně zvýšit intenzitu fotosyntézy.

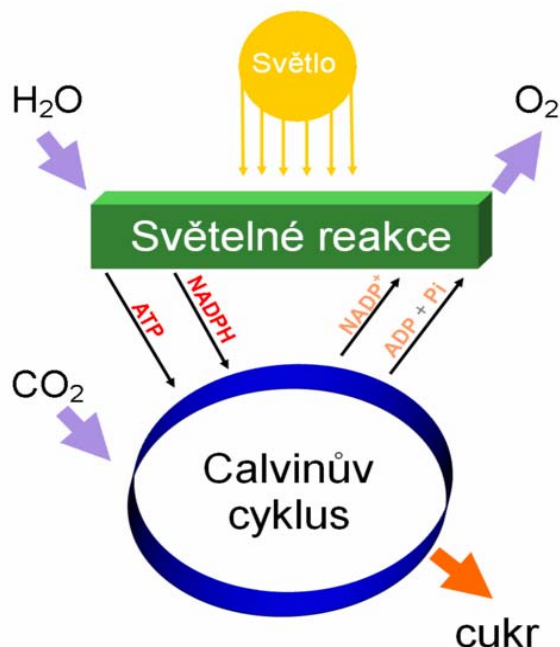
Aktivita Rubisco je také hlavním faktorem, který reguluje rychlost fotosyntézy. U enzymu Rubisco však není aktivita enzymu odrazem jeho obsahu, neboť enzym existuje v aktivované a neaktivované formě a pouze aktivovaná forma je katalyticky aktivní a navenek se projevuje určitou aktivitou. Aktivitu enzymu reguluje pH (optimum je při pH 8) a koncentrace hořečnatých kationtů. To znamená, že při stejném obsahu enzymu se může měnit jeho aktivita, proto je důležité měřit aktivitu i obsah.

Pro stanovení enzymu Rubisco, může být použito několik metod. Aktivita Rubisco se stanovuje in vivo gazometricky nebo in vitro radiometricky či spektrofotometricky. Standardní metodou pro stanovení obsahu Rubisco je vertikální elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s SDS (SDS-PAGE), dále je možné obsah enzymu stanovit také imunochemicky nebo kapilární elektroforézou.

Tato bakalářská práce se zabývá vlivem stárnutí listů na obsah enzymu Rubisco u buku lesního v podmínkách normální a zvýšené atmosférické koncentrace oxidu uhličitého. Teoretická část práce stručně pojednává o fotosyntéze a vlivu zvýšené koncentrace CO_2 na fotosyntézu. Další kapitoly jsou věnovány enzymu Rubisco, jeho významu pro fotosyntézu, jeho aktivaci a závislosti aktivity a obsahu na vnějších podmínkách. V experimentální části byly metodou SDS-PAGE sledovány změny obsahu enzymu Rubisco u buku lesního na začátku, uprostřed a na konci vegetační sezóny.

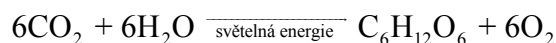
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotosyntéza



Obr. 1 Schématické znázornění fotosyntézy. Převzato z [1].

Fotosyntéza je jedním z nejstarších a současně nejdůležitějších procesů v živé přírodě. Z fyzikálního hlediska je fotosyntéza přeměna energie slunečního záření na energii chemickou. Tato přeměna je uskutečněna biologickým objektem. Chemicky představuje fotosyntéza velmi náročný děj, převedení uhlíku z nejvíce oxidované formy o nízké energii, oxidu uhličitého, do molekuly organické sloučeniny o vysoké energii – sacharidu. Jedná se o silně endergonický proces, při němž energii poskytuje sluneční záření zachycované fotoreceptory (chlorofylem), a redukovadlem je u zelených rostlin vodík z vody. Redukce CO₂ na cukry je spřažena s oxidací H₂O, vedoucí ke vzniku O₂. Fotosyntézu lze tedy vystihnout sumární rovnicí:

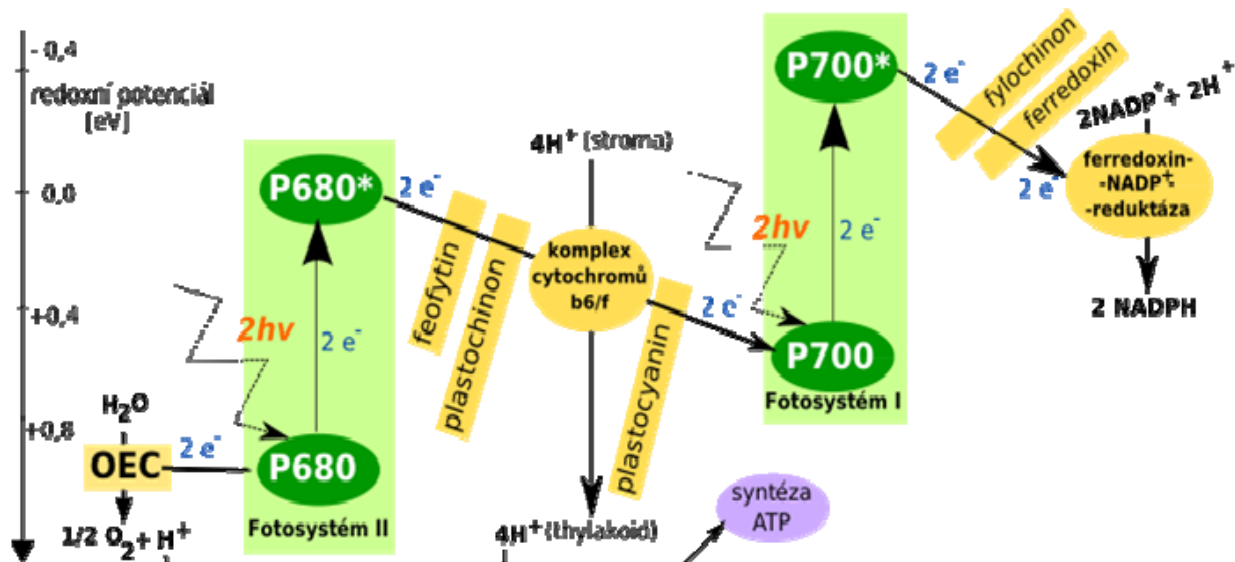


Fotosyntéza probíhá ve dvou oddělených, ale na sebe navazujících fázích – primární (světelné) a sekundární (temnostní). Světelná nebo též primární fáze je fotochemický děj spočívající v přeměně fotonů slunečního záření na chemickou energii.

Primární fázi realizuje fotosyntetický aparát, který se skládá ze tří částí tvořených:

- A) Fotoreceptory, tj. pigmenty absorbujícími záření (chlorofyl *a* a chlorofyl *b*, činnost chlorofylů často doplňují karotenoidy)
- B) Fotosyntetickým reakčním centrem provádějícím přeměnu světelné energie na energii elektrickou, tedy excitaci elektronů fotoreceptoru absorbovaným zářením.

C) Řetězcem oxidoreduktas, přeměňujícím energii excitovaných elektronů na energii chemickou.

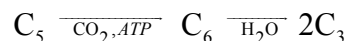


Obr.2 Z-schéma světelné fáze fotosyntézy: přenos elektronů získaných fotolýzou vody elektronovými přenašeči za pomoci energie získané fotosystémy I a II absorpcí světla. Převzato z [1].

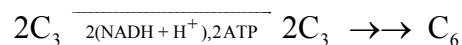
Paralelně se světelnou fází probíhá temná nebo též sekundární fáze. Probíhá bez slunečního záření a většina reakcí je identická nebo podobná jako obrácené reakce glykolýzy a regenerační fáze pentosového cyklu. Tato fáze fotosyntézy sestává ze série enzymových reakcí, které využívají energii a redukce získané v primární fázi k redukci CO_2 na cukry. Reakce probíhají v cyklických sledech a mohou probíhat několika cestami. Nejznámější z nich je cyklický děj, nazvaný podle objevitele Calvinův cyklus.

Calvinův cyklus probíhá ve třech fázích:

A) Fixace CO_2 v organické sloučenině: tato fáze slouží k převedení energeticky chudé, nereaktivní formy CO_2 na aktivovanou redukovatelnou formu. Aktivace CO_2 probíhá jeho začleněním do molekuly ketopentosy ribulosa-1,5-bisfosfátu jako karboxylu, za rozpadu vznikající nestálé sloučeniny na dvě tříuhlíkové molekuly 3-fosfoglycerátu. Reakci katalyzuje enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa.

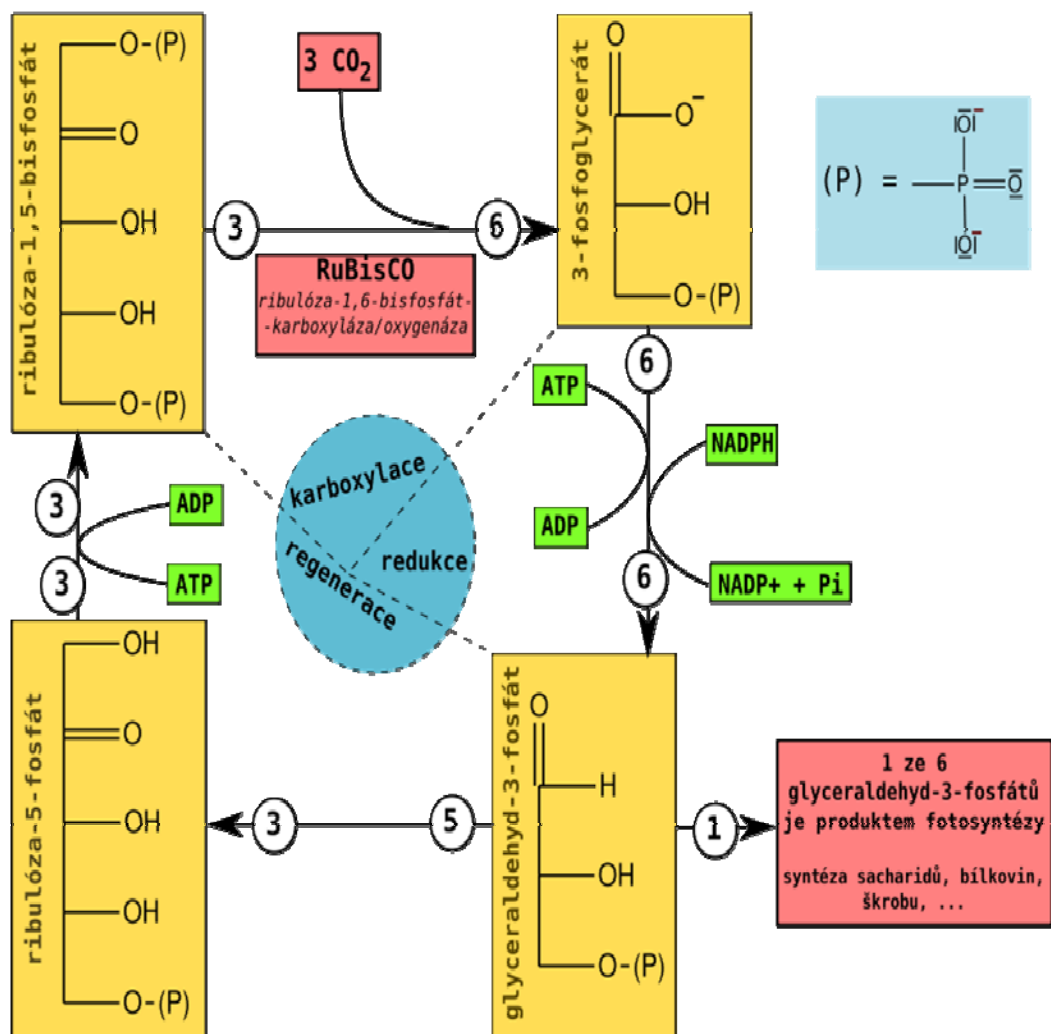


B) Redukce 3-fosfoglycerátu NADPH za spotřeby 2 ATP na 1,3-bisfosfoglycerát a dále na glyeraldehyd-3-fosfát. Z něho pak izomerací vzniká dihydroxyacetonfosfát. Část trios přechází vnější chloroplastovou membránou do cytosolu a tam se aldolovou kondenzací, katalyzovanou aldolasou, přeměňují na fruktosa-1,6-bisfosfát, ze kterého pak izomerací vzniká glukosa-6-fosfát.



C) Regenerace akceptoru CO_2 (ribulosa-1,5-bisfosfátu) je obrácenou regenerační fází pentosového cyklu. Z 5 molekul hexos se při ní regeneruje 6 molekul pentos.

U eukaryotních fototrofů se obě fáze fotosyntézy odehrávají ve specializovaných buněčných organelách, zvaných chloroplasty. Primární fáze probíhá v tylakoidech, sekundární fáze v kapalně výplni chloroplastu (stromatu) [2].



Obr.3 Schématické znázornění Calvinova cyklu. Převzato z [1].

2.1.1 Rychlost fotosyntézy

Rychlost fotosyntézy je ovlivňována řadou faktorů. Z vnitřních faktorů jde zejména o množství chlorofylu, stáří listů a minerální výživu, mezi vnější činitele patří světlo, teplota, voda a koncentrace CO_2 . Další přímé faktory jsou rychlost fotorespirace, vodivost průduchů a rychlost dýchání [4].

2.1.1.1 Vliv světla

Fotosyntézu ovlivňuje spektrum a intenzita světelného záření. Spektrum vhodné pro fotosyntézu je v rozmezí 380–760 nm. Přejedem od červených k fialovým paprskům se kvantový zisk snižuje, i když se snižující absorpce chlorofylů částečně kompenzuje doprovodnými pigmenty. Minimální intenzita světla pro začátek fotosyntézy je u různých rostlin různá. S přibývajícím intenzitou světla se rychlost fotosyntézy zvyšuje. V okamžiku, kdy se příjem a výdej CO_2 vyrovná, nastává tzv. kompenzační světelný bod. Rychlost fotosyntézy pak dále roste až do bodu světelného nasycení, kdy se ustálí. Při vysokých intenzitách světla vzniká velké množství kyslíkových radikálů, které by mohly porušit fotosystém II, a tak zastavit fotosyntézu [4].

2.1.1.2 Vliv CO_2 a jeho zvýšené koncentrace na rostliny

Vzdušný oxid uhličitý je hlavním dodavatelem uhlíku pro fotosyntézu. Jeho koncentrace ve vzduchu kolísá kolem 0,038 %. Nejnižší koncentrace, při níž začíná fotosyntéza, je 0,008–0,010 % CO_2 . Při zvyšování koncentrace se rychlost fotosyntézy zvyšuje až do nasycení (0,06–0,4 % CO_2), kdy se ustálí. Zvyšováním za hranici 2–5 % CO_2 ve vzduchu fotosyntéza ustane [4].

Vliv zvýšené koncentrace CO_2 na rychlost fotosyntézy byl studován již velmi dávno. Rostliny C_4 jsou při stávající koncentraci CO_2 tímto substrátem saturovány, naproti tomu rostliny C_3 reagují na další zvýšení koncentrace CO_2 zvýšením rychlosti fotosyntézy. Tento nárůst je spojován s působením CO_2 na enzym Rubisco (ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu/oxygenasu), ale také s regulačními účinky CO_2 na vazbu atomů Mn na donorové straně fotosystému II a vazbu chinonů na akceptorové straně téhož fotosystému. Kvantitativně nejvýznamnější je zřejmě působení na enzym Rubisco, kdy se jedná (a) o zvýšení rychlosti karboxylace, protože při standardní koncentraci CO_2 nejsou rostliny C_3 tímto substrátem saturovány, (b) o inhibici oxygenasové aktivity enzymu Rubisco (fotorespirace), která za standardní koncentrace CO_2 snižuje rychlost fotosyntézy o 20 až 50 %, (c) o aktivaci enzymu Rubisco.

Hodně prací popisuje rozdílnou reakci jednotlivých druhů a rodů na zvýšenou koncentraci CO_2 a tzv. aklimaci, tj. změny, k nimž dochází při dlouhodobém pěstování rostlin při změněných, nejčastěji zvýšených koncentracích CO_2 . Při aklimaci dochází k poklesu rychlosti fotosyntézy, snížení množství nebo aktivity Rubisco či dalších enzymů Calvinova cyklu. Kromě toho se snižuje obsah dusíku, rozpustných bílkovin a Rubisco v listech. Také klesá obsah chlorofylů, kvantového výtěžku fluorescence i fotochemického zhášení. Aklimace projevující se poklesem fotosyntetické účinnosti nastává jen tehdy, když všechny sinky rostliny vykazují nižší akumulaci kapacity než odpovídá zvýšené rychlosti produkce asimilátů. Omezení aktivit fotosyntetického aparátu při pěstování ve zvýšené koncentraci CO_2 lze vysvětlit také

následujícím způsobem. Při kultivaci rostlin v běžných podmínkách a při okolní koncentraci CO_2 odpovídá rychlost tvorby asimilátů kapacitě transportních drah i aktivitě příslušných sinků. Za této situace je exprese fotosyntetických genů řízena především světlem a stupněm vývoje rostliny. Při kultivaci v podmínkách se zvýšenou koncentrací CO_2 přesahuje rychlost tvorby asimilátů možnosti jak jejich transportu, tak i využívání sinku. Proto se začne hromadit v cytosolu sacharosa, která je transportována do vakuoly a zde invertasou rozštěpena na glukosu a fruktosu. Tyto hexosy jsou zpětně transportovány do cytosolu, kde se zvyšuje jejich koncentrace. Ovšem sacharosa může být také exportována do apoplastu, kde je zase apoplastickou invertasou rozložena na hexosy transportovatelné rovněž zpátky do cytoplazmy. Není vyloučeno, že příslušní přenašeči hexos jsou místem, odkud vzniká signál indukující pokles exprese fotosyntetických genů [3].

2.1.1.3 Vliv teploty, interakce teploty a zvýšené koncentrace CO_2

Obecně platí, že při zvýšení teploty o 10°C urychluje reakce 2–3krát. Rychlost fotosyntézy závisí na teplotě exponenciálně. Při nízkých teplotách fotosyntetizují rostliny pomalu, zvyšováním teploty rychlost roste až po hranici teplotního optima, poté pomalu klesá a při $35\text{--}45^\circ\text{C}$ se většinou fotosyntéza zastavuje. Vliv teploty na fotosyntézu se výrazněji projevuje při vyšší intenzitě světla.

Výrazný je také vliv teploty při zvýšené koncentraci CO_2 . S vyšší koncentrací CO_2 se teplotní optimum posouvá k vyšším teplotám a toto optimum se výrazně zužuje. Při zvyšování teploty silně klesá hodnota specifitního faktoru Rubisco, který udává poměr rychlosti karboxylace k rychlosti oxygenace při stejných koncentracích CO_2 a O_2 , a to jednak větším poklesem rozpustnosti CO_2 vzhledem k O_2 a také poklesem afinity Rubisco k CO_2 vzhledem k afinitě O_2 [3].

2.1.1.4 Rychlost fotorespirace

Metabolické základy fotorespirace spočívají ve schopnosti enzymu Rubisco navázat na stejný substrát (ribulosa-1,5-bisfosfát) jak CO_2 (karboxylace) tak i O_2 (oxygenace). Navázáním molekuly O_2 na uvedený substrát vzniká kromě fosfoglycerátu také fosfoglykolát, jímž začíná tzv. glykolátová cesta, která je součástí fotorespirace.

Fotorespirace je plně inhibována snížením koncentrace O_2 na 5 % a méně nebo dvoj- až trojnásobným zvýšením koncentrace CO_2 . Vzestup koncentrace CO_2 ve vzduchu obklopujícím list působí dvojím způsobem:

- (1) Zvýšení koncentrace substrátu (CO_2) zvyšuje rychlost karboxylace, a tedy fotosyntézy.
- (2) Zvýšení koncentrace CO_2 zvyšuje hodnotu poměru koncentrací CO_2/O_2 , a tím snižuje fotorespiraci. To představuje další zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy.

Existuje několik metod měření fotorespirace listů a rostlin, ale všechny mají určité nedostatky, snad i proto existuje relativně málo prací udávajících kvantitativní hodnoty fotorespirace [3].

2.1.1.5 Vodivost průduchů

Změna koncentrace CO_2 v atmosféře obklopující list ovlivňuje míru otevřenosti průduchů, která zase modifikuje jejich vodivost. Zvýšení koncentrace CO_2 vyvolává u většiny rostlin přivření průduchů. Obdobně působí i pokles rychlosti fotosyntézy, což zřejmě souvisí s koncentrací CO_2 v intercelulárách. Drake et al. [4] shrnuli výsledky 41 pokusů s 28 druhy rostlin a zjistili, že průměrné snížení vodivosti průduchů při zdvojnásobení atmosférické koncentrace činí 20 %. Pokles vodivosti průduchů způsobený zvýšením koncentrace CO_2 kolem listu nemusí vést k poklesu rychlosti čisté fotosyntézy, protože současně se zvyšuje gradient koncentrace CO_2 . Záleží pak na vzájemném poměru mezi změnou vodivosti a změnou gradientu CO_2 , jestli dojde k poklesu nebo zvýšení rychlosti čisté fotosyntézy.

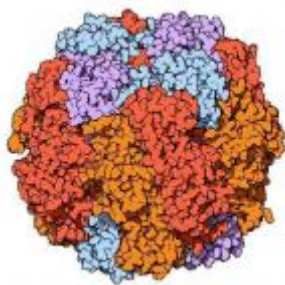
2.1.1.6 Rychlost dýchání

Rychlost dýchání je ve srovnání s rychlostí čisté fotosyntézy relativně malá. Okamžité ztráty uhlíku dýcháním odpovídají obvykle méně než 10 % jeho zisku paralelně probíhající fotosyntézou. Přesto je třeba považovat dýchání za proces významně ovlivňující celkovou bilanci uhlíku v rostlině. Dýchání probíhá nejen v noci, kdy je fotosyntéza nulová, ale i ve dne, třebaže rychlosti denního dýchání jsou patrně nižší než rychlosti dýchání v noci. Při sledování vlivu CO_2 na rychlost mitochondriálního dýchání lze rozlišit:

- 1) přímý bezprostřední vliv, při němž dochází k poklesu rychlosti dýchání při expozici zvýšené koncentraci CO_2 .
- 2) nepřímý vliv projevující se při aklimaci rostlin dlouhodobě pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 . V tomto případě však existují velmi protichůdné údaje popisující nejen inhibici, ale i stimulaci dýchání.

Novější publikace se kloní k přesvědčení, že dýchání je vyššími koncentracemi CO_2 inhibováno [5].

2.2 Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa (Rubisco)



Obr. 4 Enzym Rubisco. Převzato z [6].

Rubisco je zřejmě nejrozšířenější protein na planetě, představuje totiž přibližně polovinu hmotnosti všech proteinů v každé zelené rostlině a tvoří až 16 % veškerých bílkovin v chloroplastech. Fixuje asi 10^{11} tun CO_2 ročně.

Rubisco je enzym, který katalyzuje následující typy reakcí:

1. Karboxylaci neboli fixaci CO_2 v Calvinově cyklu temnostní fáze fotosyntézy (na ribulosa-1,5-bisfosfát se váže CO_2).
2. Oxidaci substrátu CO_2 pro fotosyntézu při fotorespiraci (na ribulosa-1,5-bisfosfát se váže O_2).

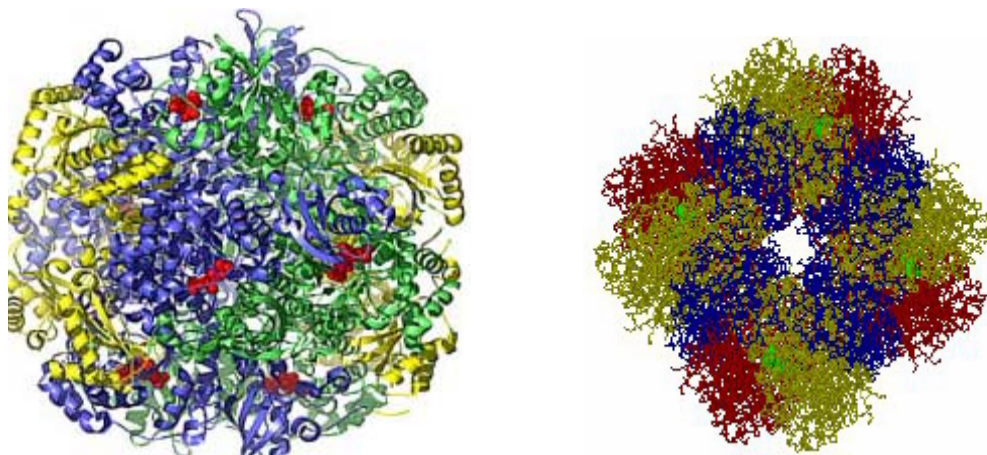
Teplotní optimum enzymu Rubisco se velmi liší podle zdrojového organismu, nejčastější hodnoty jsou 20–30 °C [6].

2.2.1 Struktura

V přírodě se vyskytuje několik odlišných forem Rubisco. Nejrozšířenější jsou formy I a II.

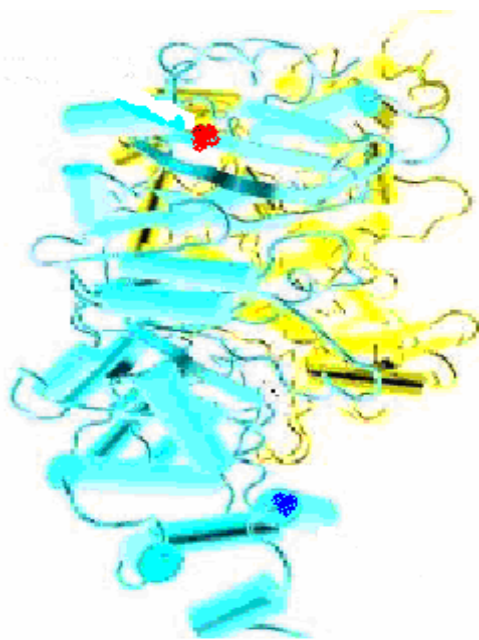
Forma I, hexadekamer L_8S_8 , se vyskytuje u většiny autotrofních rostlin (vyšší rostliny, cyanobakterie, zelené řasy). Většinou má relativní molekulovou hmotnost 550 kDa a souměrnost čtyřbokého hranolu (diedrální symetrie). Skládá z osmi velkých podjednotek (L) a z osmi malých podjednotek (S) [7]. Velké podjednotky mají relativní molekulovou hmotnost 55 kDa, obsahují aktivní centrum a mají katalytickou schopnost i bez přítomnosti malých podjednotek. Podjednotky L jsou kódovány geny *rbcL* v chloroplastech a dimerizují „hlavou k patě“. Malé podjednotky mají relativní molekulovou hmotnost 15 kDa, ovlivňují strukturu enzymu i jeho aktivitu, jsou až na výjimky kódovány geny *rbcS* jaderného genomu [6].

Malá podjednotka je syntetizována v cytoplazmě a po translaci je přenesena do chloroplastu, kde se za pomoci přítomných chaperonů spojí s velkou podjednotkou a vytvoří holoenzym. Aktivní místo leží na rozhraní mezi N-terminální doménou jedné a C-terminální doménou druhé podjednotky, proto tedy samotná podjednotka nemůže mít katalytickou aktivitu.



Obr. 5 Struktura Rubisco – forma I L_8S_8 . Enzym Rubisco se skládá z 8 velkých podjednotek (modrá a zelená barva) a z 8 malých podjednotek (žlutá a světle modrozelená barva). Červenou barvou jsou vyznačena aktivní místa. Převzato z [6].

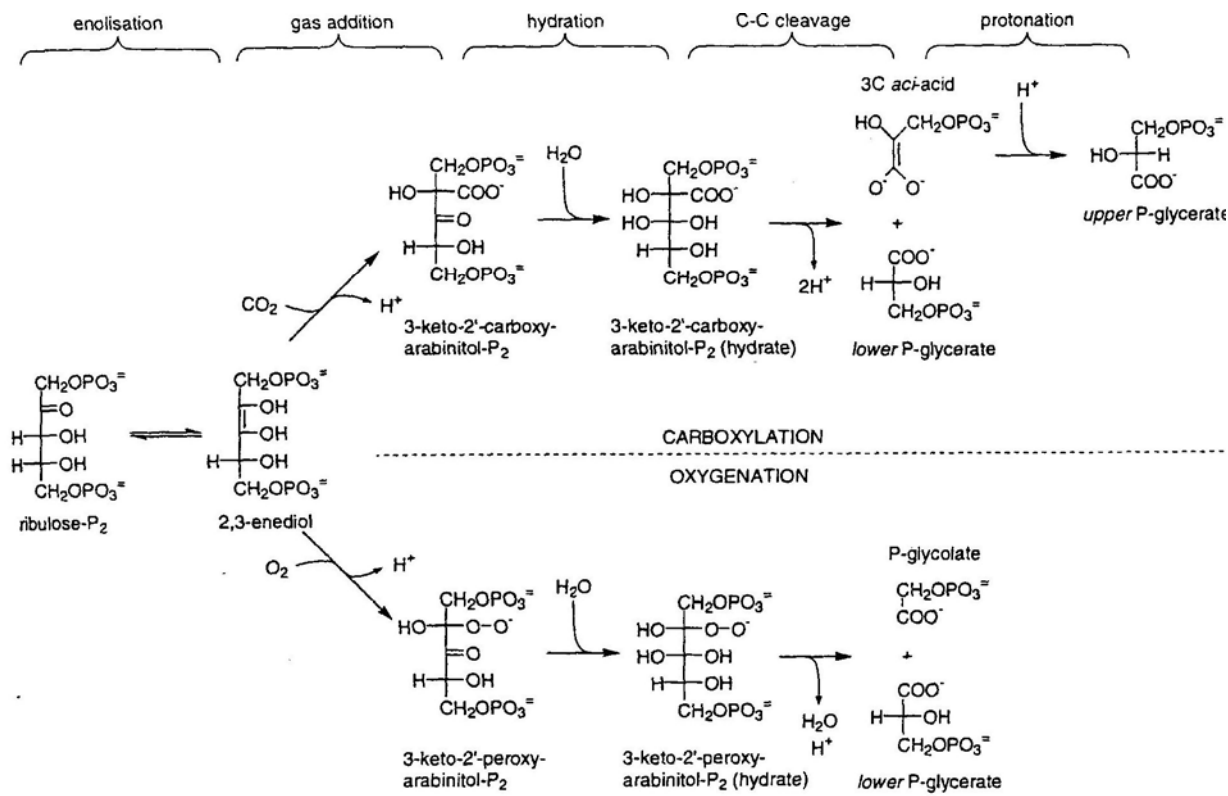
Forma II je dimer L_2 , vyskytující se u anaerobních purpurových bakterií a u obrněnek. Relativní molekulová hmotnost 110 kDa. L podjednotky jsou asi ze 30 % homologní s podjednotkami z vyšších rostlin [5].



Obr. 6 Struktura Rubisco – forma II (L_2). Tato struktura enzymu Rubisco se skládá ze dvou podjednotek, vyznačeny žlutou a modrou barvou. Červeně je vyznačená β -struktura, a modře vyznačená struktura α -helix. Převzato z [6].

2.2.2 Karboxylace a oxygenace Rubisco

Enzym Rubisco katalyzuje dva děje a to karboxylaci (vázání CO_2) a oxygenaci (vázání O_2) na ribulosa-1,5-bisfosfát (RuBP). Nejprve se RuBP přemění na endiolát, společný krok obou reakcí, a endiolát poté biomolekulárně reaguje s CO_2 nebo s O_2 . V obou reakcích je rozštěpena vazba mezi C2 a C3 [6].



Obr.7 Reakční schéma karboxylace a oxygenace. Převzato z [13].

Při karboxylaci dochází k hydrataci meziproductu, štěpení vazby C–C meziproductu a vzniku první molekuly 3-fosfoglycerátu. Dále následuje protonace karbaniontu za vzniku druhé molekuly 3-fosfoglycerátu. Podstatou mechanismu karboxylace je stabilizace přechodného meziproductu 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu vlivem komplexu karbamátu s kovovým iontem Mg^{2+} . Při navázání CO_2 proběhne Calvinův cyklus, ze 2 molekul 3-fosfoglycerátu vznikají 2 molekuly glyceraldehyd-3-fosfátu. Dále dojde k regeneraci ribulosa-1,5-bisfosfátu. Spojením dvou molekul glyceraldehyd-3-fosfátu se vytvoří sacharid [7].

Oxygenace probíhá za nepřítomnosti redox-aktivních kovů nebo organických kofaktorů. Štěpení meziproductu 2-peroxy-3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfátu uvolňuje přímo molekulu 3-fosfoglycerátu a molekulu 2-fosfoglykolátu, jímž začíná tzv. glykolátová cesta [7]. V této dráze se při postupném navázání dvou molekul O_2 uvolní jedna molekula CO_2 . Fotorespirace snižuje

čistý výtěžek fotosyntézy, ale poskytuje rostlině důležité metabolity, např. glycin a serin, dále také chrání rostlinu před nadměrným příkonem zářivé energie [9].

Zda proběhne přednostně karboxylace nebo oxygenace je určeno tzv. specifitním faktorem (Ω), který udává poměr rychlosti oxygenace ku rychlosti karboxylace při stejných rovnovážných koncentracích CO_2 a O_2 .

$$\Omega = \frac{v_c}{v_o} \cdot \frac{[\text{O}_2]}{[\text{CO}_2]} = \frac{V_c}{V_o} \cdot \frac{K_o}{K_c}$$

kde: v_c je rychlost karboxylace, v_o je rychlost oxygenace, V_c je maximální rychlost karboxylace, K_c je rychlostní konstanta karboxylace, K_o je rychlostní konstanta oxygenace a V_o je maximální rychlost oxygenace [7].

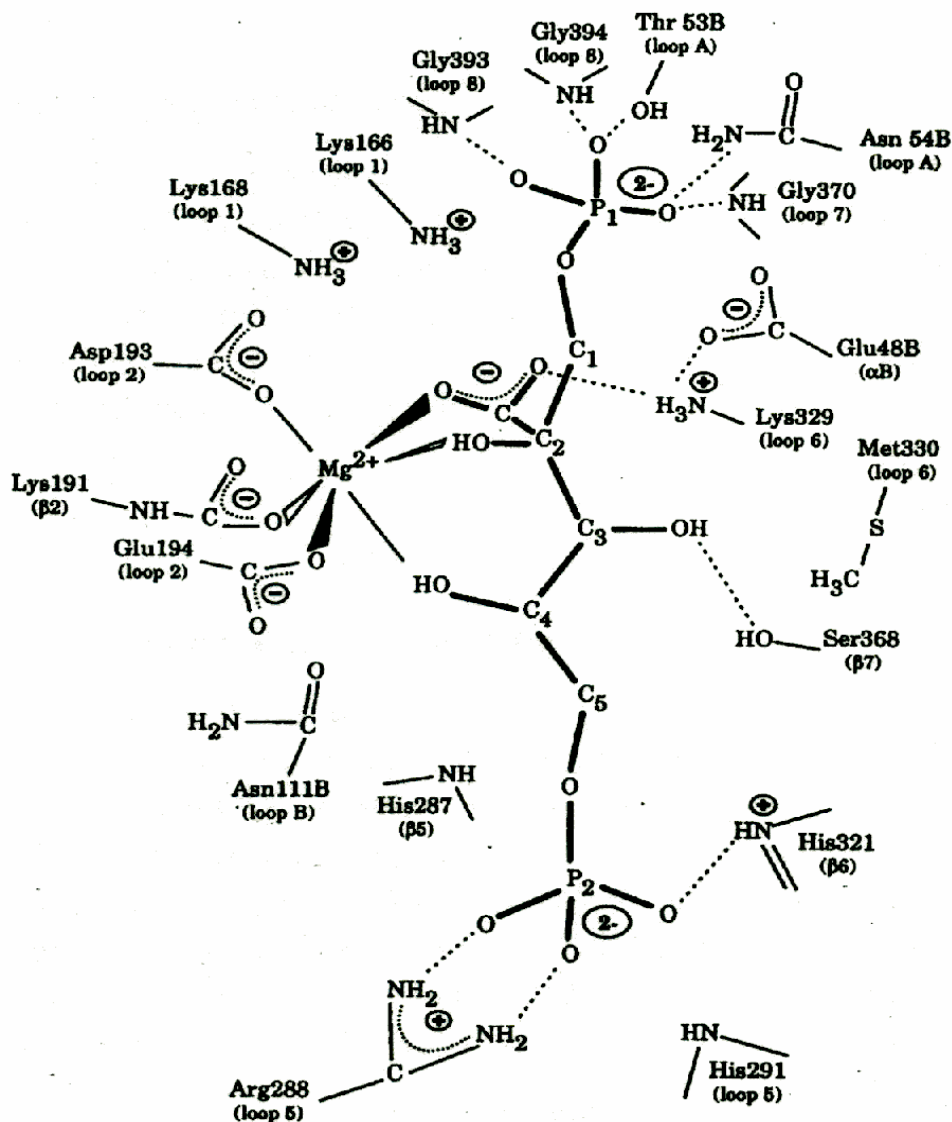
2.2.3 Aktivace Rubisco

Aby bylo Rubisco katalyticky aktivní, a bylo schopné katalyzovat jak karboxylaci (vázání CO_2) nebo oxygenaci (vázání O_2), musí být aktivováno.

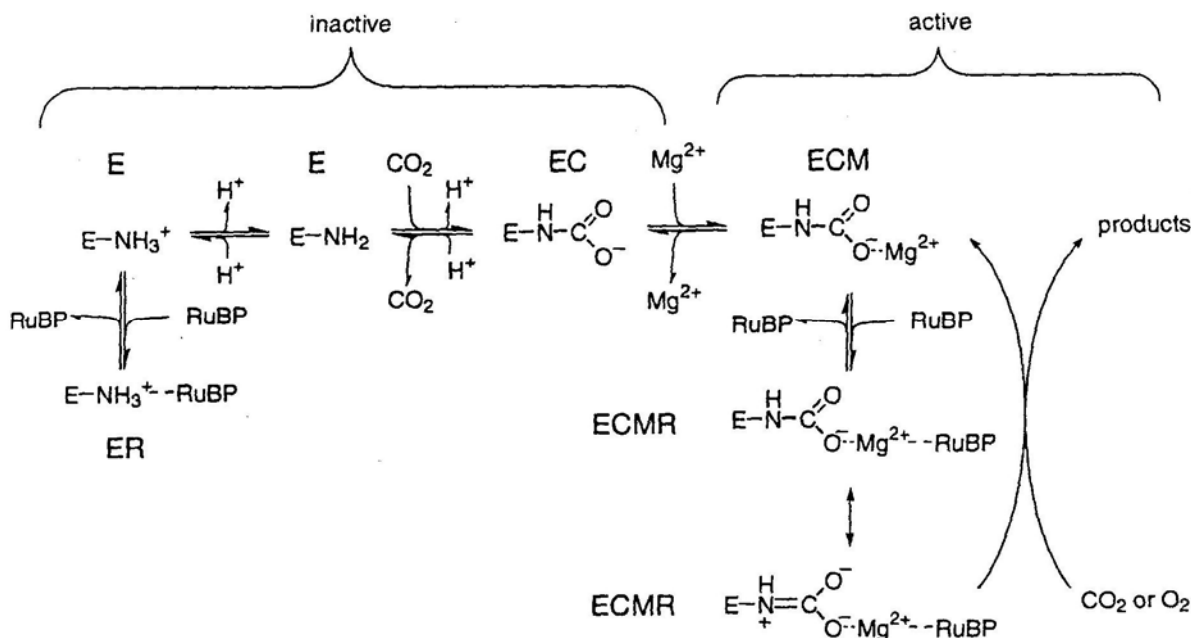
2.2.3.1 Spontánní aktivace

Nezbytným předpokladem pro katalýzu enzymu Rubisco je velmi důležité sekvenční vázání CO_2 a divalentního kovového iontu Mg^{2+} . Molekula CO_2 zahrnutá v aktivačním procesu, je odlišná od substrátové molekuly CO_2 fixované během karboxylace [8]. Tato molekula CO_2 se jako karbamát kovalentně připoutá k ϵ -amino skupině specifického lisylového zbytku K201 v aktivním místě a tento karbamát hraje klíčovou roli v katalýze. Pouze pokud je karbamát stabilizovaný kovem, je aktivní místo schopno přeměnit ribulosu-1,5-bisfosfát na produkty [10].

Karbamylace přeměňuje boční řetězec K201 z pozitivního na negativní náboj a kov koordinuje k jednomu z výsledných oxygenovaných atomů. Proto je zřejmé, že karbamylace musí proběhnout před navázáním kovu. Připojování CO_2 je velmi pomalé ve srovnání s rychlou vazbou Mg^{2+} [8]. Ribulosa- P_2 se však může také vázat k nekarbamylovanému aktivnímu, a tak zpomalí karbamylační proces [11].



Obr. 8 Aktivní místo enzymu Rubisco. N-terminální doména je tvořena Glu48, Thr53, Asn53 a Asn111, všechny ostatní zbytky jsou umístěny v β/α – stočené doméně přiléhající podjednotky. Dále můžeme na obrázku pozorovat interpodjednotku solného můstku mezi Glu48 a Lys329. Většina zbytků aktivních míst je iontových a polárních, pouze Met 330 je hydrofobní. Součástí aktivního místa je i ion Mg^{2+} , který má mnohočetné role, je nezbytný v aktivaci a katalýze. Je také rozhodující pro správnou orientaci substrátu v aktivním místě, protože CABP se váže k neaktivovanému enzymu v převráceném tvaru. Nejdůležitější v aktivním místě je Lys191, jehož ϵ -aminoskupina je karbamylována molekulou CO_2 a vzniklý karbamát se stabilizuje koordinací s Mg^{2+} . Na takto karbamylované aktivní místo se navazuje RuBP a na jeho uhlík C_2 se navazuje molekula vzdušného CO_2 . Dále jsou v aktivním místě také fosfátové ligandy, ligandy pro P_1 fosfát jsou polární a zahrnují Gly370, Gly393, Gly394, Thr53 a Asn54. P_2 fosfátová skupina je zakotvena v Arg288 a His321. Funkce ostatních zbytků aktivního místa nejsou automaticky určeny strukturou. Převzato z [7].

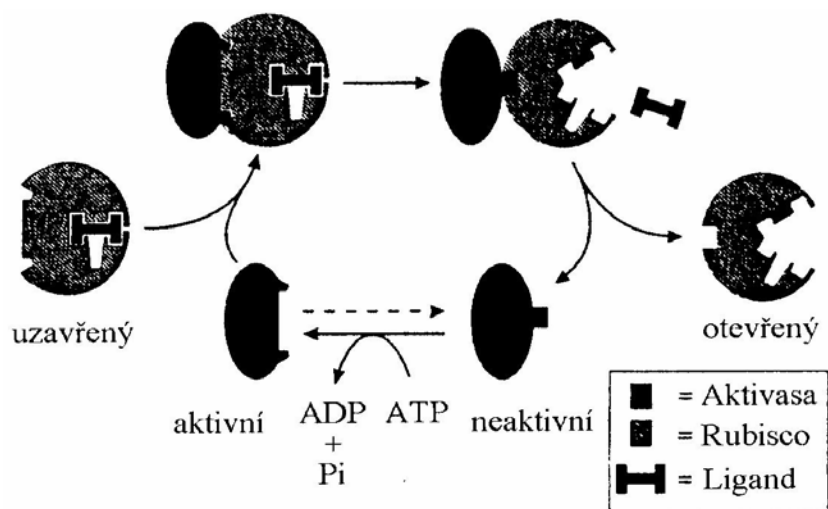


Obr.7 Aktivace Rubisco (E) karbamylací K201 (vznik EC), následným navázáním Mg^{2+} (vznik ECM). Vazba RuBP na karbamylovanou formu (ECM) nebo na nekarbamylovanou formu (ER). Převzato z [13].

2.2.3.2 Aktivace zprostředkovaná aktivasou

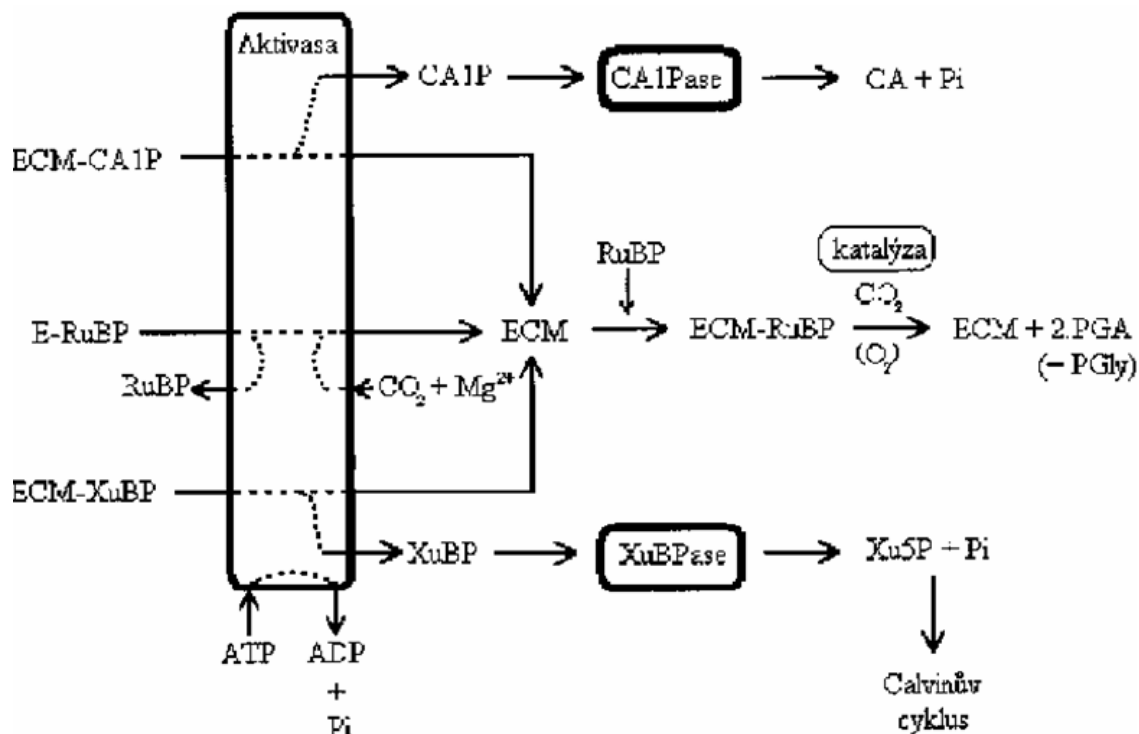
Hlavním průlomem v porozumění regulaci Rubisco *in vivo* byl objev jaderně kódovaného chloroplastového proteinu, který byl pojmenován aktivas Rubisco (Ogren et al. [7]), a který usnadňuje aktivaci Rubisco při fyziologických koncentracích CO_2 . Požadavky na aktivasovou aktivitu byly zpočátku stanoveny za použití systému s částečně purifikovanou aktivasou ze špenátových chloroplastů. Mezi nezbytné složky patřily CO_2 , Mg^{2+} , tylakoidní membrány (ve spojení s příjmem elektronů), neaktivní Rubisco, aktivas a RuBP. Po osvětlení proběhla blesková aktivace Rubisco [7].

Pro funkci aktivas je dále důležitá hydrolýza ATP. Aktivas je aktivovaná hydrolýzou ATP, na tuto aktivní aktivasu se naváže Rubisco a dojde k aktivaci Rubisco. Poté se aktivas navrátí k neaktivní formě [13].



Obr. 8 Mechanismus působení aktivasy Rubisco. Převzato z [13].

Ve tmě deaktivované Rubisco upřednostňuje pevnou vazbu s RuBP. Během osvětlení je aktivasa aktivovaná za spotřeby ATP a usnadňuje uvolnění RuBP z aktivního místa. Bez ohledu na způsob aktivace, aktivasa destabilizuje komplex enzym-RuBP a tím podporuje uvolnění RuBP. Volný enzym pak může projít karbamylací a výsledný ternární komplex může být stabilizován vazbou RuBP. Nicméně není známo proč se mění aktivita Rubisco během dne, když hladina ATP zůstává přibližně stejná [7].

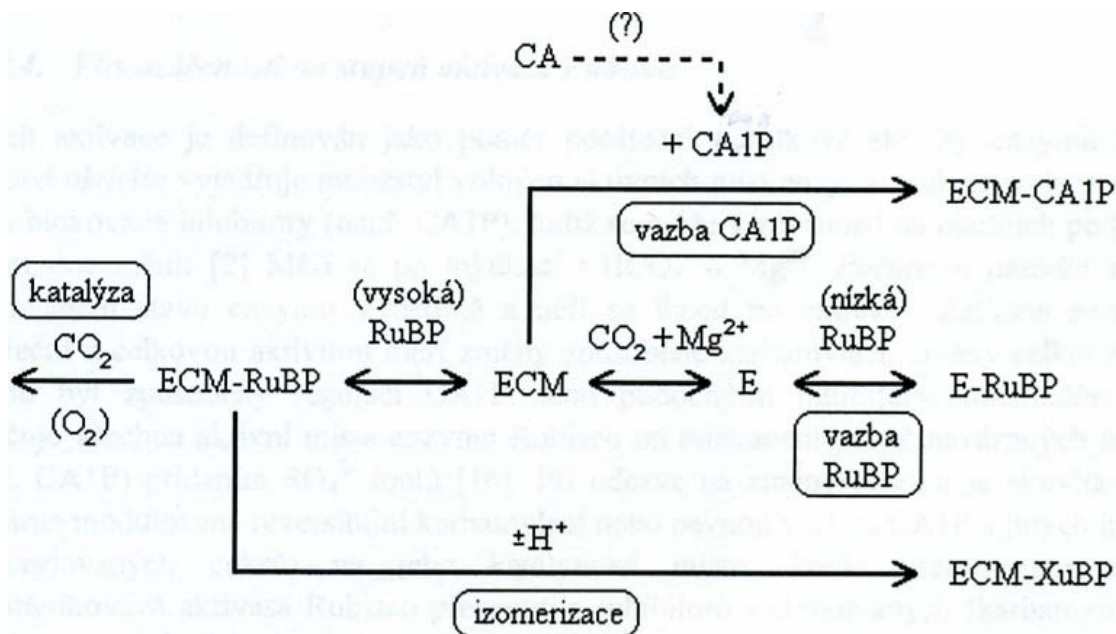


Obr.9 Přeměna vytvořené neaktivní formy enzymu Rubisco na formu aktivní způsobená aktivací aktivasou Rubisco, a následný metabolismus CA1P (2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát) a XuBP (xylulosa-1,5-bisfosfát) pomocí specifických enzymů. E – samotný enzym Rubisco a ECM aktivované Rubisco pomocí CO_2 a Mg^{2+} , CA – karboxyarabinitol, Xu5P – xylulosa-5-fosfát. Převzato z [14].

2.2.3.3 Vliv 2-karboxyarabinitol-1-fosfát na aktivitu Rubisco

Hodnocení stupně aktivace Rubisco *in vitro* je založeno na měření jeho aktivity v čerstvě připraveném extraktu z listu před a po preinkubaci při vysokém obsahu CO_2 , který je nutný k dosažení plné aktivace. Celková aktivita, tj. aktivita po preinkubaci, může souhlasit s celkovou koncentrací aktivních míst Rubisco (počítáno za pomoci syntetického reakčního meziproduktového analogu 2-karboxy-D-arabinitol-1,5-bisfosfátu (CABP) označeného uhlíkem ^{14}C). V mnoha případech je celková aktivita, získaná z extraktu tmavých listů, znatelně nižší než aktivita odhadovaná podle koncentrace aktivních míst. Jestliže jsou listy před extrakcí osvětleny, žádná taková rozdílnost tu není. Tato anomálie u extraktu z tmavých listů vedla k objevu nočního inhibitoru 2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfátu (CA1P), který se liší od CABP pouze nepřítomností C5 fosfátové skupiny. CA1P se přednostně váže na karbamylované Rubisco, tím se liší od RuBP. Vazbou CA1P na aktivní místo dojde k nevratné blokaci aktivního místa a tím inhibici katalýzy. Vliv CA1P se uplatňuje hlavně za sníženého světla, jedná se tudíž o noční inhibitor. Světlem dochází k aktivaci aktivasy, která obnovuje aktivitu Rubisco.

Dalším inhibitorem jsou epimer RuBP xylulosa-1,5-bisfosfát (XuBP) a ketoisomer 3-ketoarabinitol-1,5-bisfosfát (3-KABP), které se mohou za určitých podmínek tvořit v listech [16]. XuBP vzniká v průběhu katalytické reakce reprotonací endiolátového meziproduktu a je odpovědný za hromadění inaktivního enzymu za světla [12].



Obr.10 Schéma ukazující přeměnu aktivní formy Rubisco na neaktivní formu, navázáním CAIP (2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát), RuBP nebo izomerací substrátu na XuBP (xylulosa-1,5-bisfosfát). E – samotný enzym (neaktivní), ECM – enzym s navázaným CO₂ a Mg²⁺ (aktivní), CA – karboxyarabinitol. Převzato z [14].

2.2.3.4 Časový průběh aktivace

Aktivace Rubisco in vivo trvá 4–5 minut, deaktivace při snížené úrovni osvětlení 20–25 minut. V porovnání s dobou aktivace a deaktivace ostatních enzymů Calvinova cyklu je to poměrně dlouhá doba. Tato dlouhá doba aktivace a deaktivace enzymu má ovšem velmi pozitivní vliv na schopnost listů fixovat CO₂ v proměnných světelných podmínkách [15].

2.2.4 Vliv různých podmínek na obsah enzymu Rubisco

2.2.4.1 Vliv dusíkaté výživy

Většina dusíku v listech je vázána ve fotosyntetických složkách chloroplastů. V C₃ rostlinách se přibližně 25 % dusíku investuje do samotného Rubisco. Dusík je často vzácný a není překvapující, že obsah Rubisco v listech klesá se stářím listů, když je dusík přesouván do vyvíjejících se mladých listů. Množství Rubisco v listech se zvětšuje u rozrůstajících, zvětšujících se listů a pak klesá se stárnutím listů, přičemž existuje silná závislost mezi rychlostí asimilace CO₂ a aktivitou enzymu Rubisco [13].

Různá dusíkatá výživa má znatelný efekt na obsah Rubisco v listech. Rozdíly v obsahu Rubisco jsou také doprovázeny souběžnými změnami v dalších chloroplastových proteinech a chlorofylu, což svědčí o tom, že je udržována rovnováha mezi kapacitou karboxylace a regenerací RuBP.

Vztah mezi Rubisco a listovým dusíkem je většinou lineární. Listy s nízkým obsahem dusíku však investují více dusíku do enzymu Rubisco [17]. Mechanismus působení dusíkaté výživy na množství Rubisco je z větší části neznámý [13].

2.2.4.2 Vliv ozáření

Rostliny rostoucí při nízké ozáření mají nižší obsah Rubisco než rostliny rostoucí při vysoké ozáření [18]. Chloroplasty rostlin rostoucích na stinných místech vykazují řadu adaptivních změn, např. větší rozvoj tylakoidů. Tyto rostliny mají také menší část listového dusíku zabudovaného v Rubisco (asi 10 %), na rozdíl od rostlin rostoucích při dostatečném světle (asi 19 %). Existují druhy rostlin, které redukují množství enzymu Rubisco, pokud je vystavíme nízkému osvětlení, nebo pokud vyrůstají při nízké ozáření. Většina druhů rostlin však redukuje množství Rubisco nedostatečně vzhledem k optimální redistribuci dusíku v listech [13].

Množství Rubisco v listech se rychle mění v závislosti na změně podmínek prostředí a to dokonce i ve vyzrálých listech [18]. Mnoho prací se soustředilo na regulaci exprese Rubisco v závislosti na intenzitě světla. Tato regulace je uskutečňována různými mechanismy (různou rychlostí transkripce, translace, posttranslačních modifikací mRNA) [13].

2.3 Metody stanovení obsahu Rubisco

2.3.1 ELISA

ELISA (z angl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay), někdy také označovaná jako EIA (Enzyme Immunoassay – enzymová imunoanalýza), patří mezi citlivé neprecipitační imunochemické metody. Tato skupina metod je schopna detekovat či stanovit nízké koncentrace antigenu a protilátky, které neumožňují vznik precipitátu. Stanovení imunokomplexu antigen-protilátka lze zcitlivět navázáním vhodné značky na jednoho z imunoreaktantů ještě před uskutečněním jejich interakce. K uvedenému značení se u ELISA používají některé vhodné enzymy. Vhodné enzymy umožňují bezpečné, citlivé a poměrně jednoduché stanovení. Finální kvantifikace vždy představuje měření změny absorbance (fluorescence, chemiluminiscence) reakčního roztoku, kterou způsobil vznikající produkt enzymové reakce. Nejčastěji používanými enzymy jsou zde peroxidasa a alkalická fosfatasa [20].

Heterogenní enzymová imunoanalýza, ELISA, může být provedena jako kompetitivní nebo nekompetitivní. U kompetitivní ELISA pak rozlišujeme dvě základní provedení – přímé a nepřímé. Hodnota koncentrace analytu se vždy zjišťuje z kalibrační křivky sestavené s pomocí standardů. Nejcitlivější provedení umožňují stanovit analyt v množství 10^{-12} – 10^{-9} g. Nejčastěji používaný typ pevného nosiče při ELISA jsou stěny jamek mikrotitračních destiček z tvrzeného polystyrenu.

Při nekompetitivní (sendvičové) enzymové imunoanalýze nejprve interaguje protilátka zakotvená na pevný nosič s antigenem v analyzovaném vzorku. po ustavení rovnováhy se systém promyje a ve druhé fázi se na protilátku zachycený antigen naváže další protilátka, která je značena enzymem. Po promytí se měří enzymová aktivita zachycená zprostředkovaně na pevnou fázi.

Přímá kompetitivní enzymová imunoanalýza – protilátka zakotvená na pevný nosič interaguje současně s antigenem ze vzorku a se značeným antigenem. Značený antigen tedy soutěží s neznačeným antigenem o omezené množství vazebných míst na protilátkách. Po ustavení rovnováhy se systém promyje a měří se enzymová aktivita zachycená zprostředkovaně na pevnou fázi.

Nepřímá kompetitivní enzymová imunoanalýza – první část analýzy je kompetitivní, antigen zakotvený na pevný nosič soutěží se stanovovaným nezakotveným antigenem ze vzorku o omezený počet vazebných míst na molekulách protilátky přidávané do systému roztoku. Po ustavení rovnováhy a promytí se zjišťuje množství takto zprostředkovaně zakotvené protilátky v další nekompetitivní fázi analýzy [20].

Pro stanovení množství Rubisco je ELISA jednou z nejcitlivějších metod a je relativně rychlá. Tato metoda byla použita v práci Metoděva a Demirevské-Kepové [21].

2.3.2 Radioimunosrážecí technika

Při této technice se nejdříve získá extrakt z listů obsahující Rubisco. Enzym je potom aktivován hydrogenuhličitánovými anionty a hořečnatými kationty. Dále je pak Rubisco inkubováno

v přítomnosti radioaktivně značeného ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu a protilátkového séra se specifickou afinitou na Rubisco. Vznikne sraženina komplexu Rubisco- ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfát-protilátka, která je odfiltrována upraveným filtrem a promyta od nadbytku ^{14}C 2-karboxyarabinitol-1,5-bisfosfátu. Množství Rubisco je přímo úměrné úrovni radiace vyzařované sraženinou. Metodu je nutné kalibrovat na standard Rubisco [22].

2.3.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE neboli elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného patří mezi elektromigrační (elektroforetické) metody. Tyto metody využívají pohyb ionizovaných částic v elektrickém poli. Jestliže jsou látky nesoucí náboj rozpuštěny v elektrolytu a umístěny v elektrickém poli, začnou se pohybovat konstantní rychlostí úměrnou velikosti nábojů, anionty k anodě a kationty ke katodě. Z jednoduché aplikace Coulombova zákona vyplývá, že na částici působí „hnací“ síla:

$$F_E = qE$$

kde q je náboj částice, E intenzita elektrického pole.

V opačném směru bude působit brzdící síla vnitřního tření dána Stokesovým zákonem:

$$F_t = -6\pi\eta rv$$

kde η je viskozita roztoku, r je poloměr iontu, v je jeho rychlost.

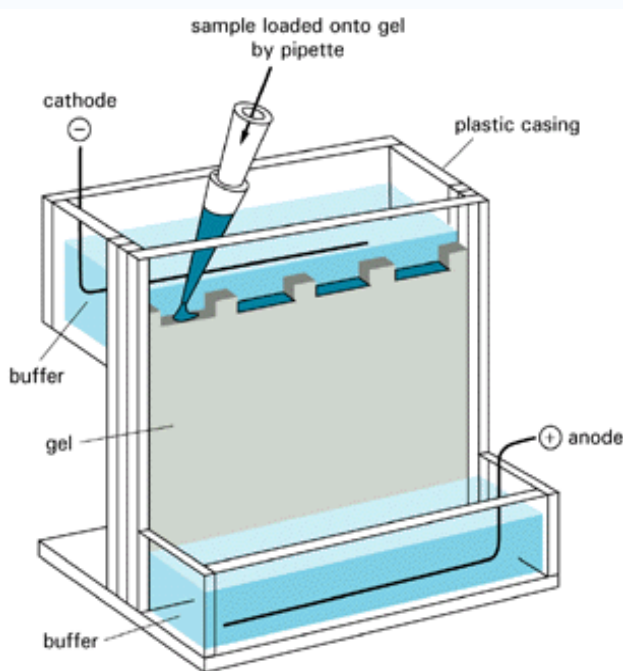
Při elektroforéze dochází velmi rychle k ustavení rovnováhy mezi silou elektrického pole a silou vnitřního tření, obě síly mají stejnou hodnotu, ale opačný směr. Rychlost pohybu iontu ve stejnosměrném elektrickém poli je přímo úměrná intenzitě vloženého pole, poměru náboje iontu k jeho velikosti a odporu prostředí. Efektivní mobilita, t.j. mobilita, kterou při elektroforéze naměříme, bývá obvykle nižší a závisí na řadě faktorů: viskozitě prostředí, teplotě, pH roztoku, iontové síle roztoku, koncentraci elektroforetického pufru.

Gelová elektroforéza patří mezi nejpraktičtější a nejvýkonnější metody používané pro dělení makromolekul. Použití porézních gelů umožňuje separaci molekul na principu síťového efektu a zároveň na elektroforetické pohyblivosti dělených látek. Zpožďují se velké molekuly proti malým, protože gel zcela vyplňuje vymezený prostor. Nejčastěji používaný nosič je polyakrylamidový gel, který se připravuje kopolymerací dvou monomerů, akrylamidu a $\text{N,N}'$ -metylen-bis(akrylamidu). Kopolymerace probíhá v roztoku pufru za přítomnosti iniciátoru – peroxodisíranu amonného. Působením světla se molekuly iniciátoru rozkládají za vzniku volných radikálů, které zahájí vlastní polymerační reakci. Jako stabilizátor volných radikálů se používá tetramethylethyldiamin „TEMED“.

Častou variantou PAGE je elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS), který se váže na bílkoviny v poměru přibližně 1,4 g SDS/1 g bílkoviny a udílí jim uniformní, záporný

náboj, který překrývá vlastní náboj proteinu. Proteiny pokryté SDS mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a podobný, válcovitý tvar. Následkem toho se při SDS-PAGE bílkoviny dělí především na základě rozdílnosti molekulových hmotností. Mnohé proteiny obsahují více než jeden polypeptidový řetězec. Působením SDS se poruší nekovalentní interakce mezi podjednotkami a pokud se přidá 2-merkaptoethanol, který redukuje disulfidové můstky, lze stanovit molekulovou hmotnost jednotlivých podjednotek [20].

Metoda SDS-PAGE je nejpoužívanější metodou ke kvantifikaci obsahu enzymu Rubisco. Metoda byla použita např. v práci Besforda [23] pro stanovení množství Rubisco v listech rajčatových rostlin. Dále se s ní můžeme setkat také v práci Ferreiry et al. [24], kde byla použita na stanovení obsahu RuBP v listech rostlin kukuřice a pšenice.



Obr. 12 Aparatura používaná metou pro stanovení množství Rubisco metodou SDS-PAGE. Převzato z [24].

2.3.4 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza je separační metoda využívající pohyb nabitých částic, ať už malých iontů či makromolekul (proteinů, fragmentů DNA) v elektrickém poli, a to buď přímo ve volném roztoku elektrolytu, nebo v nějakém nosném médiu, například gelu.

Kapilární elektroforéza využívá elektrokinetických principů elektroforézy a elektroosmózy k separaci látek uvnitř křemenné kapiláry.

Na částice analytu kromě elektrické síly působí elektroosmotický tok (neselektivní síla unášející ionty směrem ke katodě) a třecí síla působící proti pohybu částic o velikosti úměrné velikosti

částic. Odporovou sílu jde zvýšit použitím elektroforézy v síťových prostředí, kde je kapilára naplněna gelem nebo častěji je jako separační pufr použit roztok lineárních polymerů [25].

Kapilární elektroforéza je univerzální technika, která může být použita pro separaci a stanovení proteinů. Metodu kapilární elektroforézy ke stanovení vlivu zdroje dusíku na koncentraci Rubisco použil ve své práci Charles Warren [26]. Vzorek byl extrahován z listů *Eucalyptus diversicolor*. Analýza extraktů z listů byla možná teprve po vysrážení proteinů kyselinou trichloroctovou. Kapilární elektroforéza byla provedena za použití systému Bio-Rad 3000. K dělení proteinů byla použita křemenná nepotažená kapilára o průměru 50 μm , celkové délce 24 cm a efektivní délce 19,4 cm. Jako separační pufr byl použit komerční pufr CE-SDS pro stanovení proteinů. Elektroforéza probíhala při teplotě 20 $^{\circ}\text{C}$ a při konstantním napětí 15 kV. Po každém měření byla křemenná kapilára 90 s promývána hydroxidem sodným o koncentraci 0,1 mol.dm⁻³, 60 s kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 0,1 mol.dm⁻³ a nakonec 120 s proteinovým pufrem CE-SDS.

2.3.5 HPLC

Vysokotlaká kapalinová chromatografie (HPLC - high pressure liquid chromatography) je druh kapalinové chromatografie, kde je separace složek analytu urychlena čerpáním elučního činidla pod velkým tlakem. Mobilní fází je v tomto případě kapalina, stacionární fází je film příslušné látky zakotvený na povrchu nosiče nebo pevný adsorbent. Tato metoda je založena na vzniku slabých vazeb mezi složkami mobilní fáze, která obsahuje vzorek, a pevnou fází, jež tvoří náplň kolony. Složky analytu jsou k pevné fázi vázány různě velkou silou v závislosti na různých chemických či fyzikálních vlastnostech této dvojice. Složení mobilní fáze ovlivňuje rychlost separace analytu.

Metoda HPLC se pro stanovení množství Rubisco používá v menší míře v porovnání s metodami SDS-PAGE a ELISA. Při aplikaci HPLC se používá gelová kolona, kde jsou jednotlivé složky děleny podle velikosti částic [25].

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Odběr vzorků, materiál

Odběr vzorků listů buku lesního probíhal na Experimentální ekologické stanici Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech. Objekt se nachází v nadmořské výšce cca 908 m n.m. Na tomto pracovišti byly vybudovány v roce 1997 dvě minisféry pro sledování vlivu zvýšené koncentrace CO_2 na rostliny buku lesního. V jedné minisféře je koncentrace CO_2 $350 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (ambient A) a v druhé minisféře je koncentrace CO_2 $700 \mu\text{mol mol}^{-1}$ (elevated E).

Vzorky byly odebírány 22. 5. 2007 od 10:00 do 11:00 hod., 24. 7. 2007 od 11:00 do 12:00 hod a 4. 9. 2007 od 10:30 do 12:00 hod. Z odebraného listu byly korkovrtem vyříznuty 2 disky, každý o průměru 20 mm. Průmět listové plochy dvou disků byl 628 mm^2 a hmotnost asi 65 až 75 mg. Disky byly okamžitě vloženy do mikrokumavky Eppendorf a ponořeny do termosky s tekutým dusíkem.



Obr. 13 Minisféry Experimentální ekologické stanice AV ČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech. Převzato z [27].

3.2 Elektroforetické stanovení obsahu Rubisco

Stanovení obsahu enzymu Rubisco vycházelo z metod Damervalové et al. [28] a Rogerse et al. [29] a metoda byla dále upravena Floriánem [15].

3.2.1 Přístroje

Analytické váhy HR-120-EC (firma HELAGO® CZ Hradec králové) – parametry: kapacita 120g, nejmenší dílek 0,1mg, atest ČMI

Centrifuga MLW T52.1

Termoblok TDB-100 (firma BIOSAN, Riga, Lotyšsko)

Aparatura pro elektroforézu Mini-PROTEAN 3 (firma BIO-RAD, USA)

3.2.2 Chemikálie

Akrylamid (Serva)

Brilantní modř G 250 – Coomasie (SERVA)

Bromfenolová modř Na sůl (SERVA)

D-Ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa izolovaná ze špenátu – standard Rubisco (Sigma ALDRICH)

DDT – dithiotreitol (Sigma ALDRICH)

Ethanol (Lachema)

Glycerol (Sigma ALDRICH)

Glycin (SERVA)

Kyselina octová (Lachema)

2-Merkaptoethanol (Sigma ALDRICH)

Methanol CHROMASOLV® (Seidel-de-Haën)

N,N'-Methylenbisakrylamid (SERVA)

Peroxodisíran amonný (SERVA)

SDS-dodecylsulfát sodný (Sigma ALDRICH)

TEMED – N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (SERVA)

TRIS – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma ALDRICH)

3.2.3 Příprava roztoků

3.2.3.1 Roztoky pro přípravu gelů

Roztok A: 30 g akrylamidu a 0,8 g bisakrylamidu bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok B: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, pH upraveno pomocí koncentrované HCl na 8,8, poté byl roztok doplněn na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok C: 18,16 g TRIS bylo rozpuštěno v 50 ml vody, pH upraveno pomocí koncentrované HCl na 6,8, poté byl roztok doplněn na 100 ml. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

Roztok D: 10 g SDS bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Roztok nutno chránit před světlem.

Roztok E: 0,1 g peroxodisíranu amonného bylo rozpuštěno v 1 ml vody. Roztok nutno připravit pro každé stanovení čerstvý.

Roztok F: 10 mg bromfenolové modři bylo rozpuštěno v 1 ml vody. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

TEMED: komerčně dodávaný roztok

3.2.3.2 Pomocné roztoky

Elektrodotový pufr: 6 g TRIS, 2 g SDS a 18,8 g glycinu bylo rozpuštěno ve 100 ml vody. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C a používá se opakovaně.

TRIS pufr: 3,76 g TRIS, 10 g SDS, 5,02 g DTT a 50 ml glycerolu bylo rozpuštěno ve 450 ml vody. pH bylo upraveno pomocí koncentrované HCl na 6,8. Roztok se uchovává při laboratorní teplotě.

Vzorkový pufr: Smíchá se 4,8 ml roztoku C, 4 ml roztoku D, 0,2 ml roztoku F, 6 ml glycerolu, 4,8 ml vody a 1 ml merkaptioethanolu. Roztok se uchovává při teplotě 4 °C.

3.2.3.3 Roztoky k vizualizaci bílkovin

Stabilizační roztok: 100 ml methanolu a 400 ml vody.

Barvicí roztok: 0,5 g Coomassie Blue R 250, 450 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 450 ml vody.

Odbarvovací roztok: 250 ml methanolu, 100 ml koncentrované kyseliny octové a 650 ml vody.

3.2.4 Příprava gelů

Elektroforetická skla byla nejdříve omyta vodou, poté odmašťovacím přípravkem, následně opláchnuta destilovanou vodou a ethanolem. Po odpaření ethanolu byla skla upnuta do stojanu, a to tak, že větší sklo bylo vzadu. Ke stanovení byl použit 10% separační gel a 5% zaostřovací gel.

3.2.4.1 Separační gel

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 1.

Tabulka 1. Objemy roztoků k přípravě 10% separačního gelu (10 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	4,0
A	3,3
B	2,5
D	0,1
E	0,1
TEMED	0,004

Roztok E a roztok TEMED byl přidán těsně před nalitím roztoku mezi skla. Následně se roztok nalil mezi skla, do výšky asi 2 cm od horního okraje. Zbylý roztok byl ponechán v kádince jako kontrola zatuhnutí gelu. Roztok mezi skly byl okamžitě převrstven asi 3 mm vrstvou butanolu, pro správné vyrovnaní hladiny a jako ochrana proti vypařování vody. Po ztuhnutí separačního gelu byl odstraněn butanol a gel byl několikrát promyt destilovanou vodou.

3.2.4.2 Zaostřovací gel

Do kádinky byly pomocí automatických pipet odměřeny objemy roztoků podle tabulky 2.

Tabulka 2. Objemy roztoků k přípravě 5 % zaostřovacího gelu (3 ml)

Roztok	Objem (ml)
Destilovaná voda	2,1
A	1,0
C	0,38
D	0,03
E	0,03
TEMED	0,003

Po přidání roztoku E a roztoku TEMED byl zaostřovací gel rovnoměrně nalit na vrstvu ztuhlého separačního gelu až téměř po okraj a do prostoru mezi skla byl vložen elektroforetický hřebínek. Gel se nechá opět ztuhnout a hřebínek se odstraňuje až před nanášením vzorků, jinak hrozí vysychání gelu. Hotový gel je možné uchovávat v lednici, nejdéle však do dalšího dne.

3.2.5 Příprava vzorků

Navážka vzorku o známé ploše byla homogenizována ve vychlazené třecí misce s 0,03 g inertního mořského písku a 2 cm³ extrakčního pufru o pH 7,8, který obsahoval 62 mM tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2 % (w/v) dodecylsulfátu sodného (SDS), 65 mM DTT a 10% (v/v) glycerolu. Homogenát byl přelit do centrifugační zkumavky a odstředován po dobu 1 minuty. Následně bylo 0,5 cm³ supernatantu přidáno k 0,5 cm³ vzorkového pufru, obsahujícího 3% (w/v) TRIS, 5% (v/v) 2-merkapt ethanolu, 10% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerolu a 0,2% (w/v) bromfenolové modři. Směs supernatantu a vzorkového pufru byla povařena 5 minut při 100 °C. Po zchlazení byly vzorky uchovány v mrazničce při teplotě – 8 °C.

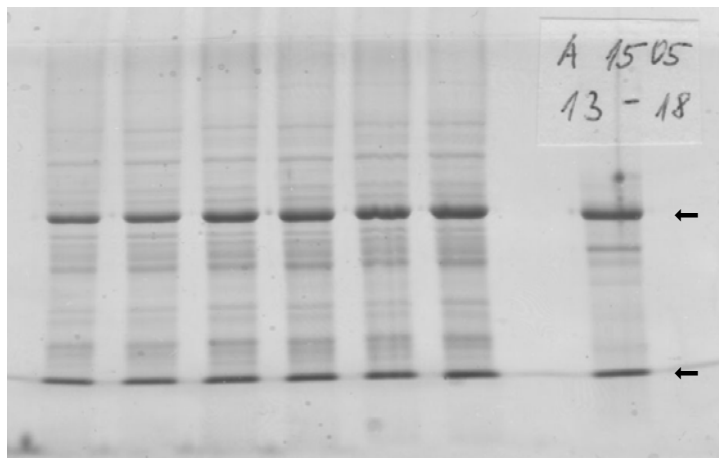
3.2.6 Elektroforéza

Skla s připraveným a dokonale ztuhlým gelem byly vytažena ze stojanu, očištěna od zbytků gelu a fixem obkreslen tvar hřebenu na zadní sklo. Opatrně byl odstraněn elektroforetický hřebínek a skla byla upevněna do stojanu pro elektroforézu větším sklem ven. Stojan byl umístěn do elektroforetické nádoby, vnitřní prostor stojanu byl zcela naplněn elektrodoým roztokem a vnější prostor byl naplněn asi do poloviny. Pomocí automatické pipety s dlouhou špičkou bylo do první pozice naneseno 10 µl standardu Rubisco (1 mg.ml⁻¹) a do každé jamky 10 µl vzorku. Aparatura byla připojena ke zdroji, kde bylo nastaveno konstantní napětí 140 V. V průběhu elektroforézy bylo nutné kontrolovat, zda elektrodoý pufr neprotéká z vnitřní části stojanu do vnější a popřípadě pufr doplnit. Elektroforéza trvala 60 minut, dokud čelo vzorku nedostoupilo asi 2 cm od spodního okraje gelu.

3.2.7 Zviditelnění bílkovin

Elektroforetická skla s gelem byla vyjmuta ze stojanu tak, aby pufr odtékl do vnější nádoby a ponořena do misky s destilovanou vodou menším sklem dolů. Pomocí umělohmotné špachtle bylo horní sklo sejmuto. Otočením spodního skla pod vodou došlo k vyklopení gelu. Voda v misce byla vylita a gel byl převrstven stabilizačním roztokem a 5 minut stabilizován na třepačce. Poté byl gel protřepán asi 30 minut s barvicím roztokem. Po uplynutí této doby byl gel promyt odbarvovacím roztokem a poté asi 90 minut protřepán s odbarvovacím roztokem do

dostatečného odbarvení. Po slití použitého roztoku byl gel promyt destilovanou vodou, položen na elektroforetické sklo a zabalen do potravinářské folie, která ho chrání před vysycháním. Hotové gely byly skladovány v chladničce při teplotě do 8 °C.



Obr.14 Hotový gel. Horní šipka značí zóny velké podjednotky, spodní šipka zóny malé podjednotky enzymu Rubisco.

3.2.8 Vyhodnocení

Zóny odpovídající velké podjednotce Rubisco byly kvantifikovány v Biofyzikálním ústavu AV ČR softwarem AIDA (Advanced Image Data Analyzer, verze 3.23.001, Raytest, Germany). Tím byly zóny velkých podjednotek enzymu Rubisco převedeny na píky (intenzita zbarvení proti vzdálenosti od okraje gelu) a integrací byla vypočítána jejich plocha. Velikost plochy byla přímo úměrná koncentraci bílkovin, proto byla koncentrace Rubisco ve vzorku vypočítána porovnáním plochy a koncentrace standardu. Protože poměr velikosti plochy a koncentrace standardu byl ovlivněn mnoha faktory, bylo nutné nanést standard Rubisco na každý gel. Z každého odběru bylo hodnoceno 10 vzorků ($n = 10$).

3.2.9 Výpočet

Obsah enzymu Rubisco byl vypočítán z velikosti plochy standardu Rubisco o známé koncentraci, plochy zóny stanovovaného vzorku a jeho plochy disku.

Vzorový příklad výpočtu obsahu

Tabulka 4

Vzorek	Plocha (m ²)	Plocha zóny	c (mg.ml ⁻¹)	c (g.m ⁻²)
standard		173478,8	0,5000	
A2407-7	0,000628	188847,0	1,0886	3,4668
A2407-8	0,000628	172554,6	0,9947	3,1677
A2407-9	0,000628	208791,9	1,2036	3,8329
A2407-10	0,000628	212104,4	1,2227	3,8938
A2407-11	0,000628	168133,2	0,9692	3,0866
A2407-12	0,000628	149845,5	0,8638	2,7509

Obsah Rubisco v 1 ml extraktu:

$$c = \frac{188847,0}{173478,8} = 1,0886 \text{ g.ml}^{-1}$$

Obsah Rubisco ve 2 ml extraktu:

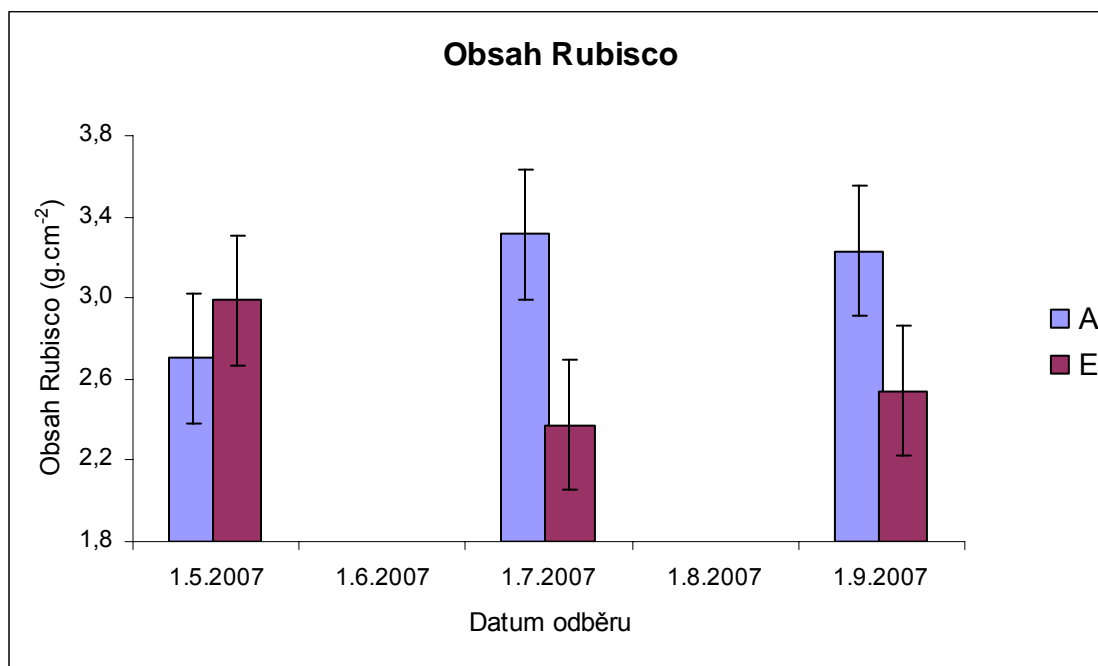
$$m = 1,0886 \cdot 2 = 2,1772 \text{ g}$$

Obsah Rubisco vztažený na jednotkovou plochu listu:

$$c = \frac{2,1772}{0,000628} = 3,4668 \text{ g.m}^{-2}$$

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Pomocí metody SDS-PAGE byl stanoven obsah enzymu Rubisco v listech buku lesního kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E). Výsledky zachycuje obr. 15.



Obr. 15 Srovnání obsahu enzymu Rubisco u buku kultivovaných při normální koncentraci CO_2 (A) a při zvýšené koncentraci CO_2 (E) ($n = 10$).

První vzorky byly odebrány 22. 5. 2007. U těchto vzorků nebyl zjištěn žádný statisticky významný rozdíl mezi obsahem enzymu Rubisco v listech A a E. Obsah enzymu u listů kultivovaných při zvýšeném obsahu CO_2 byl však vyšší než obsah enzymu u listů kultivovaných při normální koncentraci CO_2 . Další odběr proběhl 24. 7. 2007. U vzorků tohoto odběru byl obsah Rubisco u listů E o 21 % nižší nežli na jaře, zatímco u listů A byl obsah Rubisco 24. 7. 2008 o 23 % vyšší než při jarním odběru. Poslední odběr proběhl 4. 9. 2007. Oproti červencovému odběru byl zaznamenán mírný, statisticky nevýznamný vzestup obsahu Rubisco v listech E (o 7 %) a mírný, statisticky nevýznamný pokles obsahu Rubisco v listech A (o 3 %). V červenci i v září byl v listech E naměřen statisticky významně nižší obsah Rubisco, nežli v listech A.

Literatura [30] uvádí, že obsah enzymu Rubisco je největší v době plného rozvinutí listů a v průběhu vegetační sezóny postupně klesá. Tento závěr platil v našem experimentu pouze pro listy E. Současně Nie et al. [31] a Makino a Mae [32] uvádějí, že sucho a zvýšená koncentrace CO_2 urychluje stárnutí listů a tím i pokles obsahu Rubisco, proto můžeme sledovat zřetelnější pokles Rubisco u listů, které jsou kultivovány při zvýšeném obsahu CO_2 . Pokud bychom však

porovnali naše výsledky s údaji Riikonena et al. [33], kde jsou uvedeny hodnoty stanovení obsahu enzymu Rubisco u břízy, můžeme konstatovat, že výsledky se téměř shodují.

Obsah enzymu Rubisco závisí také na obsahu dusíku v rostlině. Podle Evanse [17] je vztah mezi obsahem Rubisco a listovým dusíkem lineární. Většina autorů [17, 30, 31, 32] se shoduje v názoru, že redukce obsahu Rubisco nastává pouze při nedostatečném zásobování rostliny dusíkem.

5. ZÁVĚR

Cílem práce bylo sledovat obsah enzymu Rubisco v průběhu vegetační sezóny u rostlin buku lesního (*Fagus sylvatica*) kultivovaných v podmínkách normální ($350 \mu\text{mol mol}^{-1}$) a zvýšené ($700 \mu\text{mol mol}^{-1}$) koncentrace oxidu uhličitého. Odběr vzorků probíhal na Experimentální ekologické stanici Ústavu systémové biologie a ekologie AVČR Bílý Kříž v Moravskoslezských Beskydech na začátku, uprostřed a na konci sezóny.

U všech vzorků bylo stanoveno množství enzymu Rubisco elektroforeticky metodou SDS-PAGE. Elektroforetické stanovení vycházelo z metod Damervalové et al. [22] a Rogerse et al. [23] a metoda byla dále upravena Floriánem [15].

Naše měření potvrdila, že u buků pěstovaných při zvýšené koncentraci CO_2 došlo v průběhu vegetačního období k aklimační depresi obsahu enzymu Rubisco. Hypotéza, že obsah Rubisco v průběhu sezóny klesá, se potvrdila pouze u buků kultivovaných při zvýšené koncentraci CO_2 . Naopak, u buků rostoucích v normální koncentraci CO_2 se obsah Rubisco v průběhu sezóny zvyšoval.

6. POUŽITÁ LITERATURA

- [1] Dostupné z <<http://cs.wikipedia.org/wiki/Fotosynt%C3%A9za>>
- [2] Vodrážka, Z. *Biochemie*. Academia, Praha 2002.
- [3] Nátr, L. *Koncentrace CO₂ a rostliny*, 1. vyd. Praha 6: ISV nakladatelství, 2000. 257s. ISBN: 80-85866-62-5.
- [4] Drake, B. G., Gonzalez-Meler, M. A., Long, S. P. More efficient plants: A consequence of rising atmospheric CO₂? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 609-639.
- [5] Voet, D., Voetová, J. G. *Biochemie*. Victoria Publishing, Praha 1990.
- [6] Dostupné z <<http://biomikro.vscht.cz/enzymologie/rubisco.pdf>>
- [7] Hartman, F. C., Harpel, M. R. Structure, function, regulation, and assembly of D-ribulose-1,5-bisphosphatecarboxylase/oxygenase. *Annu. Rev. Biochem.*, 1994, 63: 197-234.
- [8] Lorimer, G. H., Badger, M. R., Andrews, T. J. The activation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by carbon dioxide and magnesium ions. Equilibria, kinetics, a suggested mechanism and physiological implications. *Biochemistry* 1976, 15: 529-536.
- [9] Winkler, A., Lea, P. J., Quick, W. P. et al. Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci*, 1999, 1402: 1517-1529.
- [10] Lorimer, G. H. Ribulosebiphosphate carboxylase-aminoacid sequence of a peptide bearing the activator carbon dioxide. *Biochemistry* 1981, 20: 1236-1240.
- [11] Jordan, D. B., Chollet, R. Inhibition of ribulose biphosphate carboxylase by substrate ribulose 1,5-bisphosphate. *Biol. Chem.*, 1983, 258: 13752-13758.
- [12] Portis, A. R. Jr. The regulation of Rubisco by Rubisco activase. *Exp. Bot.*, 1995, 46: 1285-1291.
- [13] Leegood, R. C., Sharkey, T. D., von Caemmer, S. *Photosynthesis: Phisiology and metabolism*, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, 2000. ISBM 0-7923-6143-1.
- [14] Portis, A. R. Jr. Regulation of ribulosa-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1992, 43: 415-437.
- [15] Florián, J. *Krátkodobé a střednědobé změny aktivity a množství ribulosa-1,5-bisfosfátcarboxylasy/oxygenasy u Beta vulgaris a jejich vliv na rychlost fotosyntézy*. Diplomová práce. VUT Brno 2006.

- [16] Spreitzer, R. J., Salvucci, M. E. Rubisco: Structure, Regulatory interactions, and Possibilities for a Better Enzyme. *Plant Biology*, 2002, 53: 449-475.
- [17] Evans, J. R. Photosynthesis and nitrogen relationship in leaves of C₃ plants. *Oecologia*, 1989, 78: 9-19.
- [18] Krall, J. P., Shevelna, E. V., Pearcz, R. W. Regulation of photosynthetic induction state in high and low light grown soybean and *Alocasia macrorrhiza* (L.) G. Don. *Plant Physiol.*, 1995, 109: 307-317.
- [19] Prioul, J. L., Reyss, A. Rapid variation in the content of the RNA of the small subunit of ribulose-1,5-carboxylase of mature tobacco leaves in response to localised changes in light quantity. Relationships between the activity and quantity of the enzyme. *Planta*, 1998, 174: 488-494.
- [20] Káš, J., Kodíček, M., Valentová, O. *Laboratorní cvičení z biochemie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie. Nakladatelství Olomouc, s. r. o., 2000.
- [21] Metodiev, M., Demirevska – Kepova, K. Rubisco Quantitation in Leaves of Different Barley Varieties by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Experiment Botany*, 1992, 247: 155-158.
- [22] Kobza, J., Seemann, J. R. Mechanisms for the light regulation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity and photosynthesis in intact leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 85: 3815-3819.
- [23] Besford, R. T. The greenhouse effect: Acclimation of Tomato plants growing in high CO₂, relative changes in Calvin cycle enzymes. *J. Plant Physiol. Vol.*, 1990, 136: 458-463.
- [23] Ferreira, R. B., Esquivel, M. G., Teixeira, A. R. An accurate method to quantify ribulose bisphosphate carboxylase content in plant tissue. *Plant, Cell and Environment*, 2000, 23: 1329-1340.
- [24] Dostupné z <<http://www.google.cz/search?hl=cs&q=SDS+-+PAGE&lr=>>
- [25] Kašička, V. *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chem. Listy, 1997, 91: 320-329.
- [26] Warren, CH. R., Chen Z-L., Adams, A. A. Effect of N source on concentration of Rubisco in *Eucalyptus diversicolor*, as measured by capillary electrophoresis. *Physiologia plantarum*, 2000, 1: 52-58.
- [27] Dostupné z <http://www.usbe.cas.cz/lefr/kultivacni_sfery.htm>

- [28] Damerval, C., Vienne, D., Zivy, M., Thillement, H. Technical improvement in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52 – 54.
- [29] Rogers, A., Ellsworth, D. S., Humphreies, S. W. Possible eplamation of disparity between the in vitro and in vivo measurement of Rubisco activity: a study in loblolly pine in elevated CO₂. *Journal of Experimental Botany*, 2001, 52: 1551 – 1561.
- [30] Suzuki, Y., Makino, A., Mae, T. Changes in the turnover of Rubisco and levels of mRNA of *rbcL* and *rbcS* in rice leaves from emergence to senescence. *Plant, Cell and Enviroment*, 2001, 24: 1353-1360.
- [31] Nie, G. Y., Long, S. P., Garcia, R. L. et al. Effects of free-air CO₂ enrichment on the development of the photosynthetic apparatus in wheat, as indicated by changes in leaf proteins. *Plant, Cell and Environmnet*, 1995, 18: 885-864.
- [32] Makino, A., Mae, T. Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant, Cell Physiology*, 1999, 40: 999-1006.
- [33] Riikoinen, J., Holopainen, T., Vapaavuori, E. Leaf photosynthetic characteristics of silver birch during three years of exposure to elevated concentrations of CO₂ and O₃ in the field. *Tree Physiology*, 2005, 25: 621-632.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

A	minisféra s normální koncentrací oxidu uhličitého
ADP	adenosin-5'-difosfát
AIDA	Advanced Image Data Analyzer
ATP	adenosin-5'-trifosfát
CA	karboxyarabinitol
CA1P	2-karboxy-D-arabinitol-1-fosfát
CABP	2-karboxy-D-arabinitol 1,5-bifosfát
CE-SDS	kapilární elektroforéza za použití SDS
DNA	kyselina deoxyribonukleová
DTT	dithiothreitol
E	minisféra s dvojnásobnou koncentrací oxidu uhličitého
EIA	Enzyme Immunoassay
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HLPC	vysokotlaká kapalinová chromatografie
mRNA	mediátorová RNA
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
Pi	anorganický fosfát
PVC	polyvinylchlorid
RNA	kyselina ribonukleová
Rubisco	ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasa/oxygenasa
RuBP	ribulosa-1,5-bisfosfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	elektroforéza na polyakrylovém gelu za použití SDS
TCA	kyselina trichloroctová
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan
XuBP	xylulosa-1,5-bisfosfát